

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 55-118389

(43)Date of publication of application : 11.09.1980

(51)Int.Cl.

C12N 1/14  
A01G 1/04  
//(C12N 1/14  
C12R 1/645 )

(21)Application number : 53-162929

(71)Applicant : TAKEDA CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 27.12.1978

(72)Inventor : SHIMAZONO HIRAO

## (54) INCUBATION OF MYCORRHIZA-FORMING FUNGI

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain mycelia of fungi belonging to the genus Tricholoma, e.g. matsudake mushrooms, useful for food, readily in large quantities, by incubating the fungi inoculated in a medium containing a starch in a high concentration according to the aeration spinner culture method.

CONSTITUTION: Fungi, e.g. Tricholoma matsutake S. Ito IFO30588(FERN-P No. 4758) or Tricholoma bakamatsutake Hongo sp. nov. IFO30586 (FERM-P No. 4756), which belong to the genus Tricholoma, are incubated in a liquid medium containing 3W/V% of more, preferably 4W10W/V%, of a starch, e.g. rice, wheat, potato, or corn starch, at about 20W27° C and an air flow of 10W150% for 20W60 days, preferably by the submerged aeration spinner culture method to give mycelia and culture comprising the aroma component. The component is then extracted and added to impart the aroma to food.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

## ⑫ 特 許 公 報 (B 2)

昭61-53032

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup> 識別記号 庁内整理番号  
 C 12 N 1/14 B-6712-4B  
 // A 01 G 1/04 1 0 1 G-6712-4B  
 (C 12 N 1/14 7804-2B  
 C 12 R 1:645)

⑭ 公告 昭和61年(1986)11月15日

発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 菌根形成菌類の培養方法

⑯ 特 願 昭53-162929

⑰ 公 開 昭55-118389

⑱ 出 願 昭53(1978)12月27日

⑲ 昭55(1980)9月11日

⑳ 発 明 者 島 園 平 雄 宮崎市大橋1丁目119番地1  
 ㉑ 出 願 人 武田薬品工業株式会社 大阪市東区道修町2丁目27番地  
 ㉒ 代 理 人 弁理士 岩 田 弘  
 審 査 官 小 沢 誠 次  
 微生物の受託番号 FERM P-4756 FERM P-4757 FERM P-4758

1

2

## ㉓ 特許請求の範囲

1 トリコローマ属菌を3W/V%以上のでん粉類を含む培地に接種し通気攪拌下で培養することを特徴とするトリコローマ属菌の培養方法。

## 発明の詳細な説明

本発明は、トリコローマ属菌の培養方法に関する。

トリコローマ属菌は、まつたけ類あるいは菌根形成菌類として知られている。

まつたけ類は、分類学上担子菌類に属する菌根形成菌類であり、同じ担子菌類に属するシタケ、エノキタケ、ナメコ、ヒラタケ等の食用菌は、死物寄生し、木材を腐朽する木材腐朽菌に属している。これらの木材腐朽菌については、広く人工培養が行なわれており、これら菌糸の大量培養も実施されている。

これに反し、菌根形成菌類は、生きた樹木の根に寄生して、各種の栄養物を受けて生活しているものであり、木材腐朽菌とは生理的、生態的状況を全く異にしている。

まつたけ類は、マツ類やナラ、シイなどの林に発生し、これらの菌糸が樹木の根について、外生菌根(ミコリザ)を形成し、根に寄生又は共生して、樹木から栄養物の供給を受けて生活している。十二分に菌根が形成されると土壤中に真白な“シロ”として現れてくる。このシロは根に菌糸が大量にまつわりついて菌根が白く見えるもので

ある。この菌糸は寄生植物の根から切り離されると弱く、容易に死滅する。

まつたけ類の人工培養に関しては、古くから研究が行なわれており(小川ら、マツタケ菌の増殖法(1)マツタケ感染菌の育成法:日林誌 60巻(4) 119頁, 1978年;川合ら、まつたけの培養に関する研究第1報まつたけの栄養生長におよぼすC源およびN源の影響:日菌報 17巻 159頁, 1976年など)、単独に培養基上に菌糸を生育させることは可能であるが、その生長は極めておそく、現在もその培養は極めて困難なものとされている。

本発明者は、上記の事情に鑑み、まつたけ類の人工培養法について鋭意研究したところ、でんぶん類を液体培地中に高濃度に添加しまたは培養途中で添加すると同時に通気攪拌培養を行なうことにより、まつたけ類の菌糸体を大量に培養できることを見だし、これに基づいてさらに研究した結果、本発明を完成した。

本発明は、トリコローマ属に属する菌を3W/V%以上のでんぶん類を含む培地に接種し通気攪拌下で培養することを特徴とするトリコローマ属に属する菌の培養方法である。

トリコローマ(Tricholoma)属に属する種としては、まつたけ(Tricholoma matsutake (S. Ito et Imai) Sing.), およびその近縁種には、にせまつたけ(Tricholoma fulvocastaneum Hongo sp. nov.), ばかまつたけ(T.

3

4

bakamatsutake Hongo sp. nov.) や、まつたけもどき (*T. robustum*) などが知られている。

本発明において使用することができる菌の具体例としては、トリコロマ・マツタケ (*Tricholoma matsutake* S. Ito) IFO 30588 (FERM-P No. 4758), トリコロマ・フルボカスタンウム (*Tricholoma fulvocastaneum* Hongo sp. nov.) IFO 30587 (FERM-P No. 4757), トリコロマ・バカマツタケ (*Tricholoma bakamatsutake* Hongo sp. nov.) IFO 30586 (FERM-P No. 4756) などが挙げられる。これらの微生物は、上記のとおり財団法人発酵研究所および工業技術院微生物工業技術研究所にそれぞれ寄託されている。

本発明の培地としては、液体培地が用いられる。培地中に添加されるでん粉類の例としては、米でんぶん、小麦粉でんぶん、ばれいしよでんぶん、さつまいもでん粉、コーンスターチ、デキストリン等が挙げられる。

でん粉類の培地への添加量は、一般には、 $3W/V\%$ 以上であり、さらに好ましくは、 $4$ ないし $10W/V\%$ 程度である。

でん粉類の培地への添加は、培養開始時にすでに添加されているようにするのが好ましい。また、必要に応じて培養の途中で培地に加えてもよい。

トリコロマ属に属する菌の培養に用いる培地には、利用され得る炭素源、窒素源、微量栄養源などが含有される。該炭素源としては、前述のでんぶん類のほか、グルコース、フラクトースなどの単糖類、マルトース、ショ糖などの二糖類、マンニット、ソルビットなどの糖アルコール類、大豆油、オリーブ油などの油脂類などが挙げられる。該窒素源としては、酒石酸アンモニウム、ペプトン、コーンステープリカー、酵母エキス、麦芽エキス、カザミノ酸、アミノ酸混液、カゼインその他一般に利用される培養用窒素源が利用できる。該微量栄養源としては、たとえばビタミン $B_1$ 、 $B_{12}$ 、ビオチンなど種々のビタミン類およびNa、K、Mg、Mnなどの無機塩類などが挙げられる。

培養にあたって、培地中に、さらに乳製品、たとえば牛乳、粉乳、脱脂粉乳を添加すると、まつたけ類の菌糸体の生産量が増大される場合があ

る。乳製品の添加量は、固型分として、一般には、 $0.1 \sim 1W/V\%$ であり、さらに好ましくは $0.2 \sim 0.5W/V\%$ である。

培地の液性は、一般には $PH 4.0 \sim 7.5$ であり、さらに好ましくは $5.0 \sim 6.0$ である。

通気攪拌培養は、深部通気攪拌下で行なうのが好ましい。通気量としては、一般には $10 \sim 150\%$ 、さらに好ましくは、 $20 \sim 110\%$ である。攪拌は、一般には $20 \sim 250r.p.m.$ 、さらに好ましくは $30 \sim 150r.p.m.$ である。

培養温度は、通常は $20 \sim 27^\circ C$ 、さらに好ましくは、 $22 \sim 25^\circ C$ である。培養時間は、通常は $20 \sim 60$ 日間、さらに好ましくは、 $25日 \sim 40日間$ である。

このようにして得られた培養物には、まつたけの香氣成分が菌糸体および培養液の両者に含まれている。

まつたけの香氣成分を含んだ菌糸体を培養物から採取するには、一般に用いられている方法、たとえば濾過、遠心分離などの操作に付することによって行うことができる。

培養液からまつたけの香氣成分を採取するには、上記の菌糸体を分離した際に得られる濾液あるいは上清液から、有機溶媒（例、エーテル、石油エーテル、ヘキサン、クロロホルム、ベンゼンなど）を用いて抽出することなどにより行うことができる。

また、菌糸体から、上記と同様の操作でまつたけの香氣成分を抽出することもできる。

本発明方法によると、菌根形成菌類の菌糸体を大量に製造することができる。

たとえば、ブドウ糖 $1\%$ 、麦芽エキス $1.5\%$ 、酵母エキス $0.5\%$ 、 $KH_2PO_4$   $0.1\%$ を含む水性液体基礎培地に、コーン・スターチ $2, 4, 6, 8\%$ をそれぞれ添加した培地に、トリコロマ・マツタケ IFO 30588、トリコロマ・フルボカスタンウム IFO 30587 を $24^\circ C$ 、 $40日間$   $500ml$  フラスコに $150ml$  培養液を入れ振とう培養 ( $200r.p.m.$ ) で培養したときの培地 $100ml$ あたりの菌糸体収量は、次の通りである。

第 1 表

コーン・スターチの添加量 (W/V%)	湿菌糸体量 (g/100ml)	
	トリコロマ・マツタケ IFO 30588	トリコロマ・フルボカスタネウム IFO 30587
0	2.4	2.5
2	3.0	4.0
4	12.6	13.0
6	15.0	16.0
8	16.8	18.4

このようにして得られたまつたけ類の菌糸体は、まつ林、おがくず培地などに接種する種菌糸として用いることもできる。

以下に実施例を示し、本発明を更に詳細に説明するが、これらにより本発明の範囲が限定されないことはいうまでもない事である。なお、実施例においては、パーセント (%) は、とくにことわりのないかぎり、重量/容量パーセント (W/V %)

#### 実施例 1

グルコース 1%，麦芽エキス 1.0%，酵母エキス 0.5%， $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%，硫酸マグネシウム 0.05%，ビタミン $\text{B}_1$  塩酸塩 1mg/ℓ，塩化鉄微量からなる基礎培地にコーンスターチ 3% を加え、この培地 (pH5.5) 200ml を 1 ℓ エルレンマイヤーフラスコに入れ滅菌した。本培養液にマツタケ菌〔トリコロマ・マツタケ IFO 30588 (FERM-P No.4758) の斜面寒天培養物から、菌糸体を直接接種し 30 日 24℃ 振とう培養し種培養物とした。

この種培養物 200ml を、上記基礎培地にコーンスターチ 4% を加えた醗酵培地 (pH5.5) 20 ℓ を滅菌後、無菌的に加え、24℃ で 30 日通気攪拌 (15 ℓ/min, 100rpm) 培養を行った。

培養終了後、フィルタープレスにより菌糸体をあつめ、湿菌糸体 1.8kg を得た。

#### 実施例 2

実施例 1 の基礎培地において、グルコースの代りにマルトースを用い、実施例 1 と同様にしてマツタケ菌の種培養物 200ml を得た。

この種培養物 200ml を、上記の基礎培地に米でん粉 6% を加えた醗酵培地 (pH5.5) 20 ℓ を滅菌後、無菌的に加え、24℃、30 日通気攪拌 (20 ℓ/

min, 80r.p.m.) 培養を行った。

培養終了後、バスケット型遠心分離機により菌糸体をあつめ、湿菌糸体 2.5kg を得た。

#### 実施例 3

5 実施例 1 の基礎培地に米でん粉 3% を加えた培地 (pH5.5) 200ml を 1 ℓ エルレンマイヤーフラスコに入れ滅菌した。本培地にニセマツタケ菌〔トリコロマ・フルボカスタネウム IFO30587 (FERM-P No.4757)〕の斜面培養物から菌糸体 10 体を直接接種し 35 日、24℃ で振とう培養し、種培養物とした。

実施例 1 と同様の培地 20 ℓ に、上記の種培養物 200ml を接種し、24℃、25 日通気攪拌 (10 ℓ/min, 100r.p.m.) 培養を行った。

15 培養終了後、フィルタープレスにより菌体を集め、湿菌糸体 2.4kg を得た。

#### 実施例 4

グルコース 1%，麦芽エキス 1.0%，酵母エキス 0.5%， $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%，硫酸マグネシウム 0.05%，ビタミン $\text{B}_1$  塩酸塩 1 mg/ℓ，酒石酸アンモニウム 0.2%，粉乳 1.0%，塩化鉄微量からなる基礎培地にコーンスターチ 3% を加え、この培地 (pH5.5) 200ml を 1 ℓ エルレンマイヤーフラスコに入れ滅菌した。本培養液にマツタケ菌〔トリコロマ・マツタケ IFO30588 (FERM-P No.4758号)〕の斜面寒天培養物から、菌糸体を直接接種し 30 日 24℃ 振とう培養し種培養物とした。

この種培養物 200ml を、上記基礎培地にコーンスターチ 5% を加えた醗酵培地 (pH5.5) 20 ℓ を滅菌後、無菌的に加え、24℃ に 25 日通気攪拌 (15 ℓ/min, 80r.p.m.) 培養を行った。

培養終了後、フィルタープレスにより菌糸体をあつめ、湿菌糸体 2.4kg を得た。

#### 実施例 5

35 グルコース 1%，麦芽エキス 1.0%，酵母エキス 0.5%，酒石酸アンモン 0.2%，粉乳 1%， $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%，硫酸マグネシウム 0.05%，ビタミン $\text{B}_1$  塩酸塩 1 mg/ℓ，塩化鉄微量からなる基礎培地に、さつまいもでん粉 3% を加え、この培地 (pH5.5) 200ml を 1 ℓ エルレンマイヤーフラスコに入れ滅菌した。本培養液にマツタケ菌〔トリコロマ・マツタケ IFO 30588 (FERM-P No.4758)〕の斜面寒天培養物から菌糸体を直接接種し、40 日間 24℃ 振とう培養し、種培養物とし

7

た。

この種培養物200mlを上記基礎培地にさつまいもでん粉5%を加えた醗酵培地(pH5.5) 20ℓに無菌的に加え、24℃に25日間通気攪拌(10ℓ/min, 100r.p.m.)培養を行った。

培養終了後、フィルタープレスにより菌糸体をあつめ、湿菌糸体1.7kgを得た。

#### 実施例 6

グルコース1%, 麦芽エキス1.5%, 酵母エキス0.5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%, 硫酸マグネシウム0.05%<sup>10</sup>, ビタミン $\text{B}_1$ 塩酸塩1mg/ml, 塩化鉄微量からなる基礎培地に馬鈴薯でん粉3%を加え、この

8

培地(pH5.5) 200mlを1ℓエルレンマイヤーフラスコに入れ、滅菌した。本培養液にバカマツタケ菌(トリコローマ・バカマツタケ IFO 30586(微工研申請書受理番号第4756号))の斜面寒天培5養物から、菌糸体を直接接種し40日24℃振とう培養し、種培養物とした。

この種培養物200mlを上記基礎培地に馬鈴薯でん粉3%を加え滅菌した醗酵培地(pH5.5) 20ℓに無菌的に加え、24℃で30日通気攪拌(16ℓ/min, 70r.p.m.)培養を行った。培養終了後、フィルタープレスにより菌糸体をあつめ、湿菌糸体520gを得た。

BEST AVAILABLE COPY